

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
7. März 2002 (07.03.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/18432 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C07K 14/435**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/09554

(22) Internationales Anmeldedatum:  
18. August 2001 (18.08.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 42 447.3 29. August 2000 (29.08.2000) DE

(71) Anmelder: **AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH** [DE/DE]; Brüningstrasse 50, 65929 Frankfurt (DE).

(72) Erfinder: **KRAMER, Werner**; Henry-Moisand-Strasse 19, 55130 Mainz-Laubenheim (DE). **GLOMBIK, Heiner**; Am Lotzenwald 42, 65719 Hofheim (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) **Titel:** PROTEIN EXTRACTED FROM THE INTESTINES OF VERTEBRATES, WHICH ABSORBS CHOLESTEROL, AND THE USE OF THIS PROTEIN FOR IDENTIFYING INHIBITORS OF INTESTINAL CHOLESTEROL TRANSPORT

**A2**

(54) **Bezeichnung:** PROTEIN AUS DEM DARM VON WIRBELTIEREN, WELCHES CHOLESTERIN ABSORBIERT, SOWIE VERWENDUNG DIESES PROTEINS ZUR IDENTIFIZIERUNG VON INHIBITOREN DES INTESTINALEN CHOLESTERIN-TRANSPORTS

(57) **Abstract:** The invention relates to a protein extracted from the intestines of vertebrates, which absorbs cholesterol. The protein could be identified using highly affine cross-linking compounds. The invention also relates to the use of this protein for carrying out a method for identifying a compound, which inhibits cholesterol transport in the intestines.

**WO 02/18432**

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Protein aus dem Darm von Wirbeltieren, welches Cholesterin absorbiert. Das Protein konnte mittels hochaffiner quervernetzender Verbindungen identifiziert werden. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung dieses Proteins zur Durchführung eines Verfahrens zur Identifizierung einer Verbindung, welche den Cholesterintransport im Darm inhibiert.

## Beschreibung

Protein aus dem Darm von Wirbeltieren, welches Cholesterin absorbiert, sowie Verwendung dieses Proteins zur Identifizierung von Inhibitoren des intestinalen 5 Cholesterintrports.

Die Erfindung betrifft ein Protein aus dem Darm von Wirbeltieren, welches Cholesterin absorbiert. Das Protein wird mittels hochaffiner quervernetzender Verbindungen charakterisiert. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung des Proteins zur 10 Durchführung eines Verfahrens zur Identifizierung einer Verbindung, welche den Cholesterintrport im Darm inhibiert.

Beim Menschen liegen durchschnittlich etwa 50 % des Cholesterins im Darmlumen vor. Das intraluminale Cholesterin stammt vorwiegend aus der Nahrung sowie der 15 Gallenflüssigkeit. Aus der Gallenflüssigkeit wird pro Tag ca. 2 g Cholesterin abgesondert. Die intestinale Cholesterinabsorption hängt stark vom Vorliegen von Gallensalzen ab. So bewirkt eine Verabreichung von Inhibitoren der Gallensalzwiederaufnahme bzw. von Gallensalz-Sequestermitteln eine Inhibierung 20 der intestinalen Cholesterinabsorption.

Bei der Behandlung von Lipidstörungen, Atherosklerose und Herzkreislauferkrankungen ist die Inhibierung der intestinalen Cholesterinabsorption ein wichtiges Ziel. Nach vorherrschende Meinung in der Fachwelt erfolgt die intestinale 25 Cholesterinabsorption durch physikochemische Diffusion.

Bekannt sind eine Reihe von Beobachtungen im Zusammenhang mit dem Cholesterintrport, die für die Beteiligung eines Proteins sprechen. Die intestinale Cholesterinabsorption unterliegt einer großen individuellen Variabilität. Biochemische Daten aus in vitro Versuchen sprechen für eine Beteiligung von Proteinen beim 30 Cholesterinaustausch zwischen kleinen unilamellaren Vesikeln und den Bürstensaumvesikeln des Darms. Bei der intestinalen Absorption von Pflanzensterinen wie dem  $\beta$ -Sitosterin und Campesterin, die sich lediglich hinsichtlich einer

Methylgruppe ( $\beta$ -Sitosterin) bzw. einer Ethylgruppe (Campesterin) unterscheiden, konnten große Unterschiede beobachtet werden. Unter anderem beim Menschen zeigte  $\beta$ -Sitosterin eine Inhibierung der Cholesterinabsorption. Es gibt zwei hochwirksame Verbindungsklassen, welche die intestinale Cholesterinabsorption 5 inhibieren, wenn eine lumrale Verabreichung erfolgt. Die Verbindungen sind zum einen von Saponin abgeleitete Verbindungen wie Tiquesid und Pamaquesid, zum anderen bestimmte Derivate von 2-Azetidinonen.

Derivate von 2-Azetidinonen als Inhibitoren der Cholesterin Absorption sind beschrieben in Clader et al., J. Med. Chem. 39, 3684 – 3693, 1996. Absorption im 10 Sinne dieser Erfindung soll Anlagerung eines Stoffes an ein Protein und Transport dieser Stoffes mit Hilfe dieses Proteins bedeuten.

Es wurden bislang mehrere Proteine in einen Zusammenhang mit der Cholesterinabsorption gebracht. Es wurde jedoch noch kein Protein beschrieben, 15 welches eindeutig an der Cholesterinabsorption im Darm beteiligt ist. Dies führt zu einer Reihe von Nachteilen, bei der Suche nach einem rationellen Vorgehen bei der Identifizierung von spezifischen Inhibitoren der intestinalen Cholesterinabsorption. Das ist besonders auch deshalb von großer Bedeutung, da sich Inhibitoren der intestinalen Cholesterinabsorption in besonderer Weise zur Behandlung aller Arten von 20 Lipidstörungen, Atherosklerose und Herzkreislauferkrankungen eignen. Cholesterin ist in allen Zellen sowohl in der Lipid-Doppelschicht der Membranen als auch in Lipidvesikel gleichmäßig verteilt. Transportmessungen mit Vesikeln oder Zellen sind deshalb sehr umständlich und störungsanfällig.

25 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist deshalb die Bereitstellung eines Proteins, welches an der intestinalen Cholesterinabsorption beteiligt ist.

Die Erfindung betrifft deshalb ein cholesterinabsorbierendes Protein aus dem Darmgewebe eines Säuger-Organismus erhältlich durch folgende Verfahrensschritte:

30

- a) Bereitstellung von Darmzellen oder Teilen von diesen Darmzellen eines Säuger-Organismus,

- b) Bereitstellung einer radioaktiv markierten Verbindung, welche als Inhibitor der intestinalen Cholesterinabsorption wirkt, und die eine photolabile Gruppe enthält,
- c) In-Kontakt-Bringen der Darmzellen oder Teilen von diesen Darmzellen aus a) mit einer Verbindung aus b),
- 5 d) Bestrahlung des Ansatzes gemäß c) mit UV-Licht,
- e) Aufschluß der Zellen nach Bestrahlung gemäß d),
- f) Auftrennung der Bestandteile des Aufschlusses der Zellen nach Aufschluß gemäß e),
- 10 g) Nachweis eines Proteins nach Auftrennung gemäß f), welches eine Verbindung gemäß b) gebunden enthält.

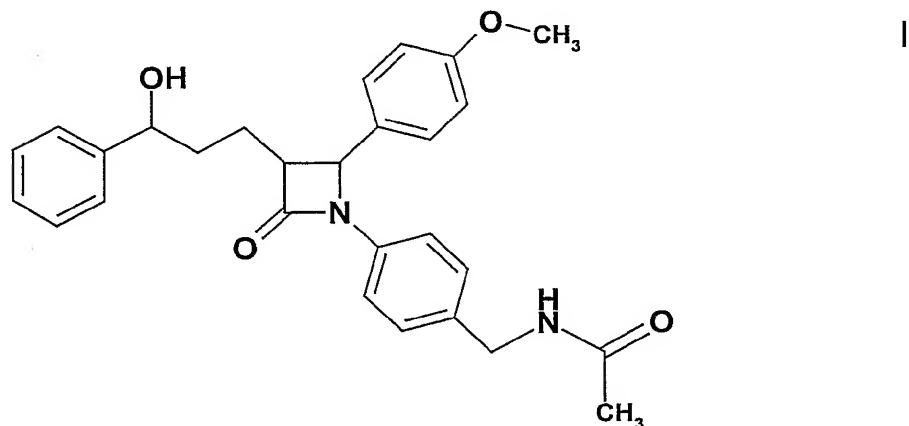
Die Bereitstellung von Darmzellen kann beispielsweise durch Präparation des Darms aus Tieren und anschließende Reinigung, enzymatischen Aufschluß des Bindegewebes und Suspendierung von Einzelzellen in isotonischen Pufferlösungen 15 erfolgen. Als Darmgewebe zur Bereitstellung von Darmzellen eignen sich unter anderem die übrig gebliebenen entsprechenden Teile von Tieren nach Schlachtungen. Darmzellen können auch aus menschlichem Darmgewebe bereitgestellt werden, nachdem Anteile des Darms operativ gewonnen wurden. Die Darmzellen können auch aus Darmzellkulturen bestehen, die für den Zweck der 20 Erfindung durch Anwendung von Zellkulturtechniken bereitgestellt werden. Teile von Darmzellen können Organellen der Darmzellen sein. Organellen sind insbesondere Membranen der Darmzellen. Membranen der Darmzellen können nach Aufschluß der Zellen durch differentielle Zentrifugation gewonnen werden. Teile von Darmzellen sind insbesondere auch Proteinfraktionen. Bereitstellung von Darmzellen oder Teilen von 25 Darmzellen sind dem Fachmann, in diesem Fall einem Biochemiker, geläufig.

Insbesondere wird auf folgende Lehrbücher verwiesen: „Basic Cell Culture, A practical approach, IRL press (1994), Herausgeber: J.M. Davis“ sowie auf „Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons (2000), Herausgeber: J. E. Coligan, B. M. Dunn, H. L. Ploegh, D. W. Speicher, P. T. Wingfield“.

30

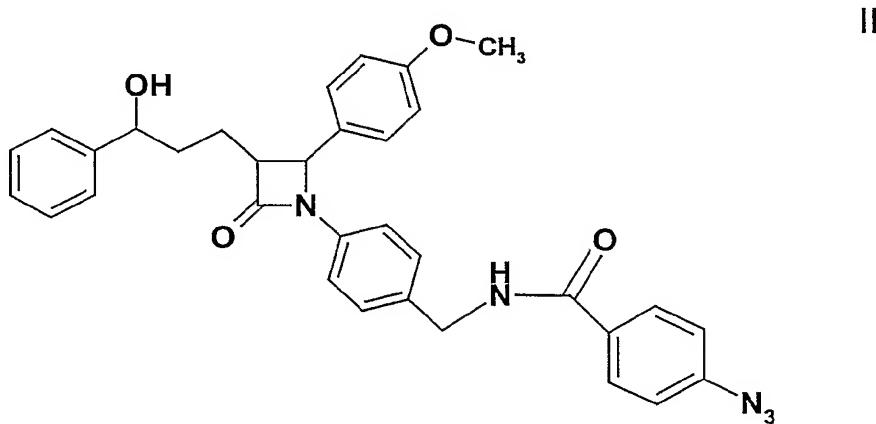
In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden Darmzellen von Mensch, Affe, Rind, Schwein, Ratte, Maus, Kaninchen oder Hamster verwendet.

Bevorzugt wird als Verbindung, welche als Inhibitor der intestinalen Cholesterinabsorption wirkt, und die eine photolabile Gruppe enthält folgende Verbindung der Formel I verwendet, welche radioaktiv markiert ist.



5 Die Verbindung der Formel I hat die Bezeichnung N-[4-[3-(3-hydroxy-3-phenylpropyl)-2-(4-methoxy-phenyl)-4-oxo-azetidin-1-yl]-benzyl]-acetamid.

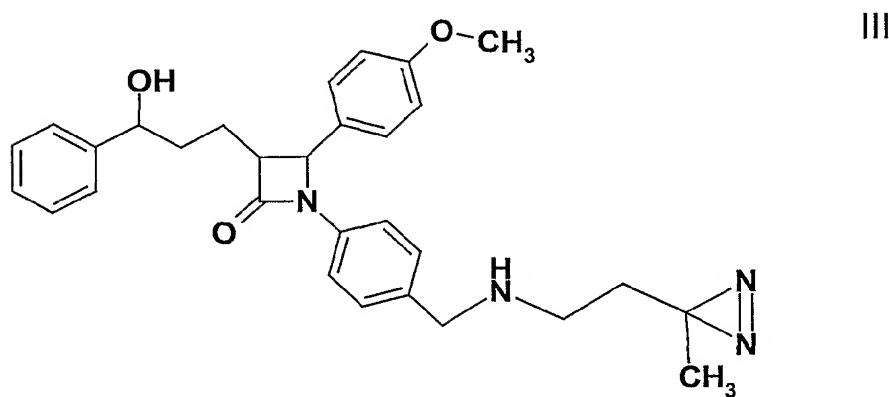
In einer weiteren bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung wird als Verbindung, welche als Inhibitor der intestinalen Cholesterinabsorption wirkt, und die eine 10 photolabile Gruppe enthält folgende Verbindung der Formel II verwendet, welche radioaktiv markiert ist.



Die Verbindung der Formel II hat die Bezeichnung

4-Azido-N-{4-[3-(3-hydroxy-3-phenyl-propyl)-2-(4-methoxy-phenyl)-4-oxo-azetidin-1-yl]- benzyl}-benzamid.

5 Weiterhin bevorzugt wird als Verbindung, welche als Inhibitor der intestinalen Cholesterinabsorption wirkt, und die eine photolabile Gruppe enthält folgende Verbindung der Formel III verwendet, welche radioaktiv markiert ist.



10

Die Verbindung der Formel III hat die Bezeichnung 3-(3-Hydroxy-3-phenyl-propyl)-4-(4-methoxy-phenyl)-1-(4-[(2-(3-methyl-3H-diazirin-3-yl)-ethylamino]-methyl]-phenyl)-azetidin-2-on.

15 Die Beschreibung der Synthese einer Verbindung der Formel I, II und III erfolgt in einem nachfolgenden Absatz in den Beispielen.

Das Protein der Erfindung kann bevorzugt einen Inhibitor der intestinalen Cholesterinabsorption binden. Besonders bevorzugt bindet das Protein Azetidinone 20 oder Saponine. Weiterhin bevorzugt kann das Protein Cholesterin binden. Die Bestimmung der Inhibition der intestinalen Cholesterinabsorption erfolgt beispielsweise mit isolierten menschlichen oder tierischen Darmzellen, Darmzelllinien oder Teilen eines menschlichen oder tierischen Darms. Hierzu wird mit markiertem Cholesterin die Absorption an die genannten Zellen bestimmt. Die Markierung des Cholesterin kann

aus einer radioaktiven oder anderen Markierung bestehen. Als radioaktive Markierung können  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  oder andere Isotope verwendet werden, die mittels dem Fachmann bekannten synthetischen Methoden in das Molekülgerüst des Cholesterin eingesetzt werden. Ein Inhibitor der intestinalen Cholesterinabsorption vermindert die Menge an 5 Cholesterin, die von den Darmzellen absorbiert wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung hat das Protein oder Teile davon eine Größe von 150 bis 25 kDa. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform hat das Protein oder Teile davon eine Größe von 150 kDa bis 32 kDa. Wieder in einer 10 besonders bevorzugten Ausführungsform hat das Protein oder Teile davon eine Größe von 150 kDa bis 42 kDa. In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform hat das Protein insbesondere ein Teil davon eine Größe von 145 kDa.

Der dargestellte Unterschied in den Größen des Proteins dieser Erfindung kann 15 dadurch zustande kommen, daß zuerst ein Vorläuferprotein gebildet wird, welches später durch Prozessierung in Teile unterschiedlicher Größe aufgespalten wird. Teile des Proteins können durch enzymatische oder nicht-enzymatische Spaltung, Auseinanderbrechen des Proteins während der experimentellen Aufarbeitung oder andere Prozesse entstehen.

20 Ausführungsformen des Proteins dieser Erfindung haben eine Größe von 140 – 150 kDa, 145 kDa, 97 kDa, 90 kDa, 80 kDa, 72 kDa, 65 kDa, 63 kDa, 60 kDa, 58 kDa, 43 kDa, 41 kDa, 36 kDa, 33 kDa, 32 kDa oder 25 kDa. In weiteren Ausführungsformen hat das Protein eine Größe von 140 – 150 kDa, 145 kDa, 97 kDa, 90 kDa, 87 kDa, 80 kDa oder 41 kDa. Wieder in anderen Ausführungsformen hat das Protein eine Größe 25 von 140 – 150 kDa, 145 kDa, 97 kDa, 58 kDa, 32 kDa. In der besonders bevorzugten Ausführungsform hat das Protein eine Größe von 145 kDa. Die Bestimmung der Größe des Proteins kann beispielsweise durch Anwendung von denaturierender Polyacrylamidelektrophorese im Vergleich mit Größenmarkern, durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie im Vergleich mit Größenmarkern, 30 Gelchromatographie im Vergleich mit Größenmarkern, Massenspektrometrie oder anderen Methoden erfolgen.

Eine bevorzugte Ausführungsform des Proteins ist glykosyliert. Die glykosylierte Form eines Proteins erkennt man daran, daß sich die Größe des Proteins vermindert, wenn das Protein mit einer Glykosidase behandelt wird. Angaben zu geeigneten Methoden zur Überprüfung der Glykosylierung findet der Fachmann in „Carbohydrate

5 Biotechnology Protocols, Methods in Biotechnology, 10 (1999) Humana Press, ISBN 0-89603-563-8, Herausgeber C. Bucke“.

Das In-Kontakt-Bringen der Darmzellen oder von Teilen aus diesen Darmzellen insbesondere von Membranen mit der radioaktiv markierten Verbindung enthaltend

10 einen Inhibitor der intestinalen Cholesterinabsorption und eine photolabile Gruppe, kann in gewöhnlichen Laborbehältnissen wie beispielsweise Eppendorf-Gefäß, Zentrifugen-Röhrchen oder Glaskolben erfolgen. Das zugrunde liegende Medium enthält beispielsweise Puffersubstanzen, Nährmediumbestandteile, Salze, Spurenelemente und anderes in wässriger Lösung.

15

Eine photolabile Gruppe in einem Molekül kann dazu verwendet werden, kovalente Bindungen zu einem in unmittelbarer Nähe befindlichen Molekül insbesondere einem Protein herzustellen. Dazu wird die Verbindung mit der photolabilen Gruppe zuerst in unmittelbare Nähe des Moleküls gebracht, zu dem die kovalente Bindung hergestellt

20 werden soll. Dies kann beispielsweise durch einen anderen Teil geschehen, der als spezifischer Inhibitor – im vorliegenden Fall der Cholesterinabsorption – eines Proteins funktioniert. Nach In-Kontakt-Bringen der Moleküle wird mit UV-Licht bestrahlt. Die Bestrahlung mit UV-Licht aktiviert die photolabile Gruppe und initiiert die Herstellung einer kovalenten Bindung mit dem wechselwirkenden Molekül insbesondere mit einem

25 Protein. Als photolabile Gruppe eignen sich beispielsweise Diazirin, Azido oder Carbonylfunktionen.

Zur Bestrahlung kann eine gebräuchliche UV-Lampe wie sie beispielsweise zum Sichtbarmachen von Polynukleotiden mit eingelagertem Ethidiumbromid oder zur Entkeimung von Laborflächen verwendet wird oder ein photochemischer Reaktor

30 (erhältlich unter anderem von der Firma „The Southern Ultraviolet Company, Hamden, CT“) eingesetzt werden. Der Aufschluß der Zellen nach Bestrahlung mit UV-Licht wird

mit üblicherweise zum Zellaufschluß angewendeten Methoden durchgeführt. Solche sind beispielsweise wiederholtes Einfrieren und Wiederauftauen, die Behandlung der Zellen mit Ultraschall, die Verwendung einer French-Press oder die Zugabe eines Detergents und Enzymen. Die Auftrennung der Proteine des Zelllysates kann

- 5 beispielsweise durch Fällung mit Ammonsulfat, durch differentielle Zentrifugation oder Anwendung von chromatographischen Techniken ausgeführt werden. Hierfür geeignete chromatographische Techniken sind beispielsweise denaturierende oder nichtdenaturierende Polyacrylamideelektrophorese in einer oder zwei Dimensionen, die Hochdruckflüssigkeitschromatographie, Ionenaustauschchromatographie oder
- 10 Affinitätschromatographie. Diese Techniken sind dem Fachmann geläufig und werden beispielsweise ausführlich in den bereits erwähnten „Current Protocols in Protein Science“ abgehandelt.

Der Nachweis eines Proteins nach der Auftrennung erfolgt mittels der radioaktiven

- 15 Markierung der Verbindung enthaltend einem Inhibitor der intestinalen Cholesterinabsorption und eine photolabilen Gruppe. Als radioaktives Isotop hierfür kann beispielsweise  $^3\text{H}$  oder  $^{14}\text{C}$  verwendet werden. Als Nachweismethode eignet sich beispielsweise die Erfassung des Proteins, welches eine Verbindung kovalent gebunden enthält, mittels eines zur Röntgenphotographie verwendeten Filmmaterials,
- 20 nachdem das Protein mit Hilfe einer Polyacrylamideelektrophorese auf einem Polyacrylamidgel aufgebracht wurde. Andere geeignete Nachweismethoden sind Flüssigkeits-Szintillations-Zählung oder Flachbett-Scanning.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Arzneimittel enthaltend ein Protein der Erfindung.

- 25 Dieses Arzneimittel kann beispielsweise zur Behandlung einer Erkrankung der Cholesterinaufnahme oder Cholesterinausscheidung, von Lipidstörungen, Atherosklerose oder Herzkreislauferkrankungen verwendet werden. Das Arzneimittel kann weitere Stoffe oder Hilfsstoffe enthalten, die beispielsweise zur Stabilisierung oder Formulierung des Arzneimittels nötig sind. Der Beitrag des Proteins zur
- 30 Arzneimittelwirkung kann beispielsweise durch Bindung des Cholesterins im Darm erfolgen.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung eines Proteins wie vorstehend beschrieben zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung einer Erkrankung der Cholesterinaufnahme oder Cholesterinausscheidung, von Lipidstörungen, Atherosklerose oder Herzkreislauferkrankungen.

5

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Identifizierung einer Verbindung, welche die intestinale Cholesterinabsorption inhibiert, wobei das Verfahren folgende Verfahrensschritte enthält

a) Bereitstellung eines Proteins dieser Erfindung,

10 b) Bereitstellung einer Verbindung,

c) In-Kontakt-Bringen eines Proteins gemäß a) mit einer Verbindung gemäß b),

d) Bestimmung der Bindung der Verbindung aus b) an das Protein aus a).

Zur Bereitstellung eines Proteins der Erfindung zur Durchführung eines Verfahrens wie

15 vorstehend beschrieben können grundsätzlich alle Zellen, welche solch ein Protein ausbilden und insbesondere Zellen aus dem Bürstensaum des Darmgewebes von Säuger-Organismen verwendet werden. Als Säuger-Organismen, aus denen diese Darmzellen gewonnen werden, können beispielsweise Mensch, Affe, Rind, Schwein, Ratte, Maus, Kaninchen, Hamster oder eine andere Wirbeltierspezies ausgewählt

20 werden. Die Bereitstellung kann durch Präparation von Zellsuspensionen aus dem Bürstensaumgewebe des Darms solcher Organismen erfolgen. Geeignetes Material des Darms erhält man beispielsweise durch operative Eingriffe. Andere Quellen können sich aus übrig gebliebenen Teilen von Tieren nach Schlachtungen ergeben. Ebenso geeignet sind Zellen einer Darmzelllinie. Das Darmgewebe kann zur

25 Herstellung geeigneter Zellpräparationen einer Enzymbehandlung zur Freisetzung von Einzelzellen unterworfen und anschließend differentiell zentrifugiert werden. Die entstehenden Zellen oder Organellen werden anschließend in geeigneten wässrigen Medien aufgenommen. Diese wässrige Medien können Puffersubstanzen, Salze, Proteine sowie weiterhin Hilfsstoffe enthalten.

30

Die Bereitstellung eines Proteins zur Durchführung des Verfahrens kann auch mittels eines in vitro Systems erfolgen. Dazu kann das Protein dieser Erfindung aus Zellen

beispielsweise des Bürstensaums des Darms von Säuger-Organismen mit Hilfe chromatographischer Techniken gewonnen werden. Die Bereitstellung einer Verbindung für das vorstehend genannte Verfahren erfolgt beispielsweise durch chemische Synthese. Die Verbindung kann Teil einer Sammlung chemischer

5 Verbindungen sein, wie sie durch Lagerung und Katalogisierung der chemischen Verbindungen aus abgeschlossenen Syntheseprogramme entstehen (sogenannte „Compound-Libraries“). Die Verbindung kann in anderen Fällen von einem Mikroorganismus insbesondere einem Bakterium, einem Pilz oder einer Tier-oder Pflanzenspezies gebildet worden sein (Naturstoffe). Im Fall eines Naturstoffes kann

10 die Bereitstellung auch durch Isolierung aus dem entsprechenden Organismen erfolgen. Das In-Kontakt-Bringen eines Proteins mit einer Verbindung zur Durchführung des Verfahrens erfolgt häufig in wässrigen Lösungen, denen ein bestimmter Anteil eines Lösungsmittel wie beispielsweise Dimethylsulfoxid oder Ethanol beigemischt sein kann. Die wässrigen Lösungen enthalten meist weiterhin

15 Puffersubstanzen, Ionen oder stabilisierende Zusätze wie Proteine, Glycerin oder anderes. Für das In-Kontakt-Bringen können bestimmte konstante Bedingungen beispielsweise für die Temperatur, den pH-Wert, die Ionenbedingungen, die Konzentration des Proteins, der Verbindung oder des Volumens vorteilhaft sein. So kann es beispielsweise günstig sein, die Temperatur während des In-Kontakt-Bringens

20 konstant bei 37°C oder bei Raumtemperatur zu halten. Die Bestimmung der Bindung der Verbindung an das Protein nach Ausführung des In-Kontakt-Bringens erfolgt beispielsweise in Wechselwirkung mit radioaktiv oder auf andere Weise markiertem Cholesterin, wobei die Verdrängung des Cholesterin als ein Maß für die Affinität der Verbindung zum Protein verwendet wird.

25

Die Erfindung betrifft auch ein Arzneimittel, welches eine Verbindung enthält, die nach Anwendung eines Verfahrens zur Identifizierung einer Verbindung, welche die intestinale Cholesterinabsorption inhibiert, als intestinaler Cholesterininhibitor identifiziert werden konnte. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung einer

30 Verbindung, welche gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren identifiziert wurde, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung einer Erkrankung der

Cholesterinaufnahme oder Cholesterinausscheidung, von Lipidstörungen, Atherosklerose oder Herzkreislauferkrankungen.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Gewinnung eines Proteins der Erfindung 5 wobei das Verfahren folgende Verfahrensschritte enthält:

- a) Bereitstellung einer Zelle enthaltend ein Protein der Erfindung,
- b) Bereitstellung eines chemischen Konjugats bestehend aus einem Polymer, wobei das Polymer eventuell über einen Spacer an einen Inhibitor der intestinalen Cholesterinabsorption kovalent gebunden ist,
- 10 c) Aufschluß der Zelle aus a)
- d) In-Kontakt-Bringen des Aufschlusses aus c) mit einem chemischen Konjugat aus b),
- e) Separierung der nicht gebundenen Proteine und anderen Moleküle des Aufschlusses aus c) vom chemischen Konjugat,
- 15 f) Elution der Proteine, welche nach In-Kontakt-Bringen gemäß d), mit chemischen Konjugat eine stabile Verbindung eingegangen sind sowie gegebenenfalls weitere Reinigung.

Als Zelle, welche ein Protein dieser Erfindung enthält, kann eine Darmzelle eines 20 Wirbeltiers verwendet werden. Als Säuger-Organismen, aus denen solche Darmzellen gewonnen werden, können beispielsweise Mensch, Affe, Rind, Schwein, Ratte, Maus, Kaninchen oder Hamster ausgewählt werden. Die Bereitstellung kann durch Präparation von Zellsuspensionen aus dem Bürstensaumgewebe des Darms erfolgen. Geeignetes Material des Darms erhält man beispielsweise durch operative Eingriffe. 25 Andere Quellen können sich aus übrig gebliebenen Teilen von Tieren nach Schlachtungen ergeben. Geeignet sind auch Zellen einer Darmzelllinie. Das Darmgewebe wird zur Freisetzung von Einzelzellen beispielsweise einer Enzymbehandlung unterworfen oder differentiell zentrifugiert. Die entstehenden Präparationen der Zellen oder Organellen werden anschließend in geeigneten 30 wäßrigen Medien aufgenommen. Diese wäßrige Medien können Puffersubstanzen, Salze, Proteine sowie weiterhin Hilfsstoffe enthalten. Die Zellpräparation wird zur Gewinnung eines Proteins dieser Erfindung einem Aufschluß unterworfen. Der

Aufschluß der Zellen wird mit den üblicherweise zum Zellaufschluß angewendeten Methoden durchgeführt. Solche sind beispielsweise wiederholtes Einfrieren und Wiederauftauen, die Behandlung der Zellen mit Ultraschall, die Verwendung einer French-Press oder die Zugabe eines Detergents und Enzymen.

5

Die Bereitstellung eines chemischen Konjugats bestehend aus einem Polymer, wobei das Polymer eventuell über einen Spacer an einen Inhibitor der intestinalen Cholesterinabsorption kovalent gebunden ist, erfolgt durch chemische Synthese. Das Konjugat wird nach der Synthese in ein wäßriges oder organisches Lösungsmittel

10 aufgenommen. Die stabile Verbindung eines Proteins zu diesem chemischen Konjugat kann über affine Bindungen, über hydrophile oder hydrophobe Wechselwirkung oder in anderer Weise erfolgen. Diese Verbindung des Proteins mit dem chemischen Konjugat kann durch Zuführen von geeigneten Elutionsmitteln wieder gelöst werden. Solche geeigneten Elutionsmittel enthalten beispielsweise hohe Konzentrationen eines

15 Stoffes, der sich zu einer affinen oder anderen Wechselwirkung kompetitiv verhält.

Der Aufschluß der Zellen, der wie soeben beschrieben hergestellt wurde wird mit dem chemischen Konjugat in Kontakt gebracht. Dazu kann das chemische Konjugat zuvor als Suspension in eine Chromatographiesäule eingefüllt werden. Der Aufschluß wird

20 dann nach Packen der Säule auf das affinitätschromatographische Material aufgetragen und mit einem wäßrigen Lösungsmittel eluiert, welches Puffersubstanzen, Salze, Proteine und Hilfsstoffe insbesondere Stabilisatoren, Lösungsvermittler oder Konservierungsstoffe enthalten kann. Die Elution bewirkt eine Separierung der nicht gebundenen Proteine und anderer Moleküle, die nicht einem Protein dieser Erfindung

25 entsprechen, vom chemischen Konjugat. Anschließend werden die Proteine eluiert, welche nach In-Kontakt-Bringen des Aufschlusses mit dem chemischen Konjugat eine stabile Verbindung eingegangen sind. Dies kann beispielsweise durch Verwendung ansteigender Konzentrationen des Inhibitors geschehen,

30 welcher in dem chemischen Konjugat enthalten ist. Als Alternative kann ein anderer Inhibitor der intestinalen Cholesterinabsorption verwendet werden. Die eluierten Proteine können einer weiteren Reinigung beispielsweise mittels anderer

chromatographischer Techniken wie Ionenaustauschchromatographie, Polyacrylamideelektrophorese, Gelchromatographie, Hochdruckflüssigkeitschromatographie unterworfen werden.

5 In einem bevorzugten Verfahren zur Gewinnung eines Proteins der Erfindung wie vorstehend beschrieben enthält das chemische Konjugat ein Polymer, gegebenenfalls einen Linker, sowie einen Inhibitor der Cholesterinabsorption aus der Saponin- oder 2-Azetidinon-Reihe insbesondere eine Verbindung der Formel I, II oder III dieser Erfindung.

10

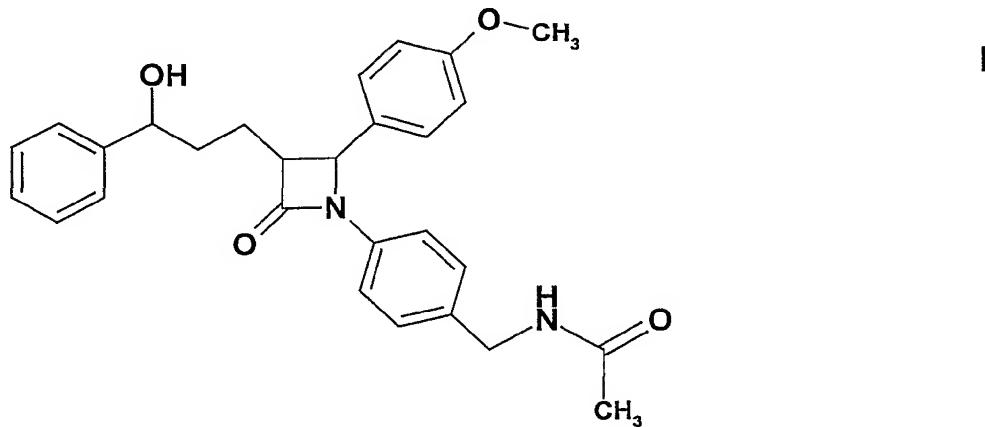
Die Erfindung betrifft weiterhin ein chemisches Konjugat bestehend aus einem Polymer, wobei das Polymer eventuell über einen Spacer an einen Inhibitor der intestinalen Cholesterinabsorption kovalent gebunden ist. Solch ein Inhibitor ist in einer bevorzugten Ausführungsform ein Saponin oder eine Verbindung der Formel I, II oder III.

15 III.

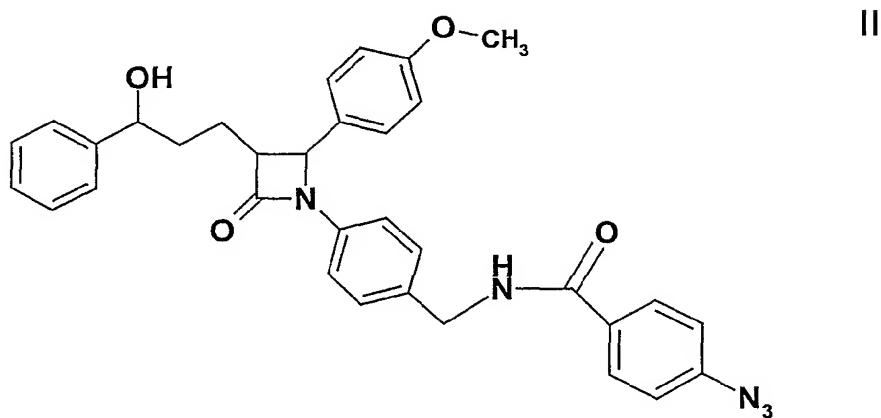
Die Erfindung betrifft weiterhin ein chemisches Konjugat dieser Erfindung, wobei dieses ein Protein dieser Erfindung gebunden enthält.

20 Die Beschreibung der Darstellung eines chemischen Konjugats mittels chemischer Synthese erfolgt in den Beispielen.

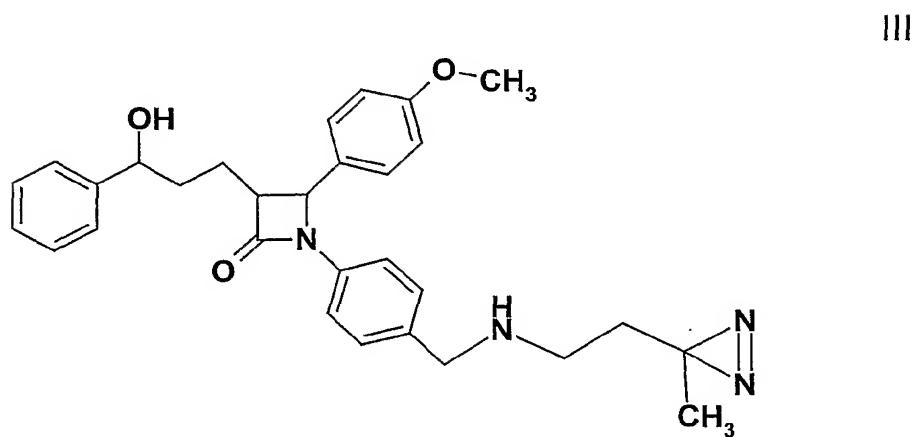
Die Erfindung betrifft eine Verbindung der Formel I.



Die Erfindung betrifft weiterhin eine Verbindung der Formel II.



5 Die Erfindung betrifft auch eine Verbindung der Formel III.



Eine Verbindung der Formel I, II oder III kann zum Nachweis eines Proteins dieser  
 10 Erfindung (Photolabel) verwendet werden. Eine Verbindung der Formel I, II oder III  
 eignet sich auch als Inhibitor eines cholesterinabsorbierenden Proteins.  
 Die vorliegende Erfindung bezieht sich deshalb auch auf einen diagnostischen Kit,  
 welcher mindestens eine Verbindung der Formel I, II oder III enthält, sowie  
 Reagenzien zur Ausführung eines Assays zum Nachweis eines Proteins dieser  
 15 Erfindung.

Die Erfindung bezieht sich auch auf die Verbindungen 4-[3-(3-Brom-3-phenyl-propyl)-2-(4-methoxy-phenyl)-4-oxo-azetidin-1-yl]- benzonitril, 4-[3-(3-Hydroxy-3-phenyl-propyl)-2-(4-methoxy-phenyl)-4-oxo-azetidin-1-yl]- benzonitril oder 1-(4-Aminomethyl-phenyl)-3-(3-hydroxy-3-phenyl-propyl)-4-(4-methoxy-phenyl)-azetidin-2- on. Diese 5 soeben genannten Verbindungen können zur Herstellung einer Verbindung der Formel I, II oder III verwendet werden.

Beispiele:

10

Es wurden Inhibitoren der intestinalen Cholesterinabsorption synthetisiert (Verbindungen der Formel I, II oder III). Diese Verbindungen enthalten photolabile Gruppen, die mittels UV-Licht mit anderen Molekülen insbesondere Proteinen quervernetzt werden können, und sind radioaktiv markiert mit einer spezifischen 15 Aktivität von größer 1 Ci/mmol. Diese Verbindungen wurden verwendet, um ein Protein der intestinalen Cholesterinabsorption zu identifizieren.

Beispiel 1:

20 Photoaffinität und Bindungsstudien:

Vesikel aus dem Bürstensaumgewebe des Dünndarms von Kaninchen wurden mittels dem Fachmann bekannten Methoden isoliert (Kramer et al. J. Biol. Chem. 268, 18035 – 18046 (1993)). Die Photoaffinitätsmarkierung unter Verwendung einer radioaktiv 25 markierten Verbindung der Formel I, II oder III dieser Erfindung wurde in einem photochemischen Reaktor des Typs Rayonet RPR-100 (erhältlich von der Firma „The Southern Ultraviolet Company, Hamden, CT“) ausgeführt. Die Bürstensaumvesikel davon (100 bis 200 µg Protein) wurden mit einer der Verbindungen für 5 Min. bei 20 °C im Dunkeln in einem Volumen von 200 µl in 10 mM Tris/Hepes-Puffer (pH 7,4), 100 30 mM NaCl, 100 mM Mannitol inkubiert. Anstelle der Bürstensaumvesikel können auch Organellen insbesondere Membranen aus diesen verwendet werden. Für diese gilt das im folgenden ausgeführte entsprechend. Nach der Inkubation im Dunkeln wurde

mit UV-Licht von 254 nm für 20 Sekunden bzw. 60 Sekunden bestrahlt. Danach wurden die Bürstensaumvesikel zweimal mit dem genannten Puffer gewaschen. Die Proteine wurden mittels üblicher Techniken wie beispielsweise Versetzen mit Ethanol, Zugabe eines Salzes oder Detergents, Erhitzen, wiederholtes Einfrieren und 5 Wiederauftauen oder einer anderen geeigneten und dem Fachmann bekannten Methode gefällt und durch SDS-Polyacrylamidelektrophorese aufgetrennt. Die radioaktiv markierten Proteine konnten durch LSC oder Fluorographie nachgewiesen werden. Die Affinität der markierten Proteine aus dem Bürstensaumgewebe für die Verbindungen lag in einem Bereich von 1 bis 10 nM.

10

Identifizierung eines intestinalen Proteins, welches Cholesterin absorbiert.

Aus Bürstensaummembranen des Darms von Kaninchen wurden Vesikel präpariert. Diese wurden mittels einer radioaktiv markierten Verbindung der Formel I, II oder III 15 markiert. Die Proteine wurden gefällt und auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Bei Verwendung der Verbindung der Formel I konnten Proteine mit einem Molekulargewicht von 145 kDa, 97 kDa, 72 kDa, 63 kDa, 58 kDa, 41 kDa 32 kDa, und 20 25 kDa markiert werden (Fig. 1a). Mit der Verbindung der Formel II konnten Verbindungen mit einem Molekulargewicht von 145 kDa, 97 kDa, 87 kDa, und 41 kDa markiert werden. Den stärksten Einbau zeigte das Protein mit dem Molekulargewicht von 145 kDa. Durch Solubilisierungsexperimente mit nichtionischen oder zwitterionischen Detergentien und Natrium-Carbonat konnte für die Proteine mit dem 25 Molekulargewicht 145 kDa, 97 kDa, 58 kDa und 32 kDa gezeigt werden, daß diese integrale Membranproteine sind. Die Angabe der Molekulargewichte der Proteine erfolgt vorbehaltlich eines gewissen Unschärfebereichs, welche bedingt ist durch die verwendete Methodik der SDS-Polyacrylamidelektrophorese., aber auch von anderen entsprechenden Methoden bekannt ist. Die Schwankungen der 30 Molekulargewichte bewegen sich in einem Bereich von bis zu +/- 10 %. Die angegebenen Werte stellen die Mittelwerte aus mehreren Versuchen dar. Im Falle des Proteins mit dem angegebenen Molekulargewicht von 145 kDa ergab sich aus den

Bestimmungen des Molekulargewichts von 10 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelektrophorese ein Mittelwert von 145,3 kDa mit einer Standardabweichung von +/- 7,55 kDa.

5 Weitere Photomarkierungsstudien wurden mit bekannten Inhibitoren der intestinalen Cholesterinabsorption durchgeführt. Dazu wurden Derivate von S3302 hergestellt. Die Verbindung S3302 ist ein Razemat des Cholesterininhibitors SCH 48461. Diese Verbindung inhibiert sehr effektiv die intestinale Cholesterinabsorption in Kaninchen, Hamstern, Hunden, Rhesusaffen und dem Menschen (Davis et al., Atherosclerosis 10 109, 162 – 163 (1994); Bergman et al.; XII International Symposium on Drugs affecting Lipid Metabolism; conference reports (1995)). Die Verbindung SCH 58235 (Literatur eben genannt) zeigt in Hamstern im direkten Vergleich eine 50 fach gesteigerte Wirkung. Dieser Effekt wird durch Einführung einer zusätzlichen (3S)-Hydroxy-Gruppe in Position R2 erklärt. Es konnte ein analoges Wasserstoff-Derivat von SCH 15 48461 hergestellt werden (= S6503), welches ähnliche Wirksamkeit im in vivo Versuch wie SCH 58235 zeigte. S6503 bewirkt in Analogie zu seiner starken in vivo Wirkung der Cholesterinresorption im Vergleich zu S3302 eine stärkere Hemmung der Markierung des Proteins mit dem Molekulargewicht von 145 kDa. Keiner der verwendeten Inhibitoren der Cholesterinabsorption zeigte in den in vivo Versuchen 20 nennenswerten Einfluß auf Gallensalze, Glukose, Oligopeptide, Alanin, Fettsäuren oder den  $\text{Na}^+/\text{Gallensalz}$ -Transportweg.

Photoaffinitätsstudien mit Bürstensaummembranen isoliert aus Kaninchen, denen für 10 Tage eine Diät mit hohen Cholesterinmengen verabreicht worden war, zeigten eine 25 deutlich stärkere Markierung des Proteins mit dem Molekulargewicht von 145 kDa (Fig. 2).

Aus dem vorstehend ausgeführten ergibt sich, daß ein Protein dargestellt werden konnte, welches eine intestinale Cholesterinabsorption bewirkt. Damit konnte die 30 Aufgabe dieser Erfindung gelöst werden.

Beispiel 2:

Bereitstellung eines chemischen Konjugats aus einem Polymer und einer Verbindung, welche als Inhibitor der intestinalen Cholesterinabsorption wirkt

Ein Aminoalkylderivat einer Verbindung, die als Inhibitor der intestinalen

5 Cholesterinabsorption wirkt (5-100  $\mu$ mol) insbesondere eine Verbindung der Formel I, II oder III dieser Erfindung wird in 1 - 5 ml Puffer / 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> / 0,5 M NaCl (pH 8,3) gelöst. Polymere Trägermaterialien, die aktivierte Carboxylgruppen mit oder ohne Spacer enthalten, wie beispielsweise eine Hi-Trap Säule mit einer N-Hydroxysuccinimidyl-aktivierten Hexylcarbonsäure als Spacer (Pharmacia

10 Biotechnology) werden entsprechend den Vorschriften des Herstellers zur Konjugation vorbereitet. Die aktivierte Matrix wird 0,5 - 5h mit obiger Lösung eines Aminoalkylderivats eines Cholesterinabsorptionshemmers inkubiert. Anschließend werden nicht umgesetzte aktivierte Carboxylgruppen durch mehrfaches sequentielles Spülen mit jeweils 5-15 ml folgender Puffer neutralisiert:

15 0,5 M Ethanolamin / 0,5 M NaCl (pH 8,3)  
0,1 M Natriumacetat / 0,5 M NaCl (pH 4,0)

Anschließend wird die Konjugatsäule durch Spülen mit 10 mM Natriumphosphat-puffer (pH 7,4) / 1% n-Octylglucosid für die Affinitätschromatographie vorbereitet.

20 Anreicherung von Bindeproteinen für Cholesterinabsorptionsinhibitoren durch Affinitätschromatographie

Biologische Membranen aus Zellen, welche Cholesterintransportproteine enthalten (2-20 mg Protein) wie beispielsweise Bürstensaummembranen von Darmzellen, werden

25 bei einer Proteinkonzentration von 0,5 - 2,5 mg/ml in 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) / 1% n-Octylglucosid 1 h bei 4 °C solubilisiert. Nach Abtrennung von verbleibendem partikulären Material durch Zentrifugation wird die klare überstehende Lösung, welche die solubilisierte Membranproteine enthält, auf die oben beschriebene Konjugatsäule aufgetragen und die Elution von Protein mittels UV-Absorption verfolgt.

30 Nach Auswaschen nicht retardierter Proteine werden die an der Säule haftenden spezifischen Bindeproteine für Cholesterinabsorptionshemmer durch Aufbringen von Lösungen, welche Cholesterinabsorptionsinhibitoren in Konzentrationen von 1-10 mM

enthalten oder die 1-5% an nichtionischen Detergentien wie Triton X-100 enthalten, eluiert.

Die Bindeproteine für Cholesterinabsorptionsinhibitoren werden anschließend in diesen Eluaten durch elektrophoretische Auftrennung separiert und ihre molekulare 5 Größe bestimmt. Durch Ausschneiden der entsprechenden Proteinbanden kann mit dem Fachmann geläufigen Methoden durch Sequenzierung ihre Aminosäuresequenz bestimmt werden oder es können durch subkutane Deposition der Gelstücke, welche die aufgetrennten Proteine enthalten, in verschiedenen Tierspezies Antikörper gegen die einzelnen Proteine erzeugt werden.

10

Beispiel 3:

Im folgenden wird die Herstellung einer Verbindung der Formel I, II oder III sowie eines radioaktiv markierten Derivats einer Verbindung der Formel I, II oder III beschrieben:

15 4-[3-(3-Brom-3-phenyl-propyl)-2-(4-methoxy-phenyl)-4-oxo-azetidin-1-yl]- benzonitril

16.0 g 4-[2-(4-Methoxy-phenyl)-4-oxo-3-(3-phenyl-propyl)-azetidin-1-yl]-benzonitril werden in 180 ml Tetrachlorkohlenstoff gelöst und mit 9.4 g N-Bromsuccinimid und 940 mg Benzoylperoxid versetzt. Man erwärmt unter Rühren zum Rückfluss und

20 kontrolliert durch Dünnschichtchromatographie. Nach ca. 30-50 min ist die Umsetzung beendet. Die Lösung wird bei Raumtemperatur mit Ethylacetat versetzt, dann mit gesättigter Natriumbisulfatlösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wird über Kieselgel mit Ethylacetat/Heptan=1:2 als Laufmittel gereinigt. Man erhält das Bromid als zähes Öl.

25 MS(FAB): 477 (M1+H<sup>+</sup>),

475 (M2+H<sup>+</sup>) [C<sub>26</sub>H<sub>23</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> M=475].

4-[3-(3-Hydroxy-3-phenyl-propyl)-2-(4-methoxy-phenyl)-4-oxo-azetidin-1-yl]- benzonitril

30 17 g 4-[3-(3-Brom-3-phenyl-propyl)-2-(4-methoxy-phenyl)-4-oxo-azetidin-1-yl]- benzonitril werden in 500 ml Dioxan gelöst, mit 34 ml ~40 proz. Tetrabutylammonium-trifluoracetat-Lösung versetzt und 24 h zum Rückfluss erhitzt. Die Mischung wird auf

ca. die Hälfte eingeengt, mit Wasser und Methyl-tert.-butyl-ether versetzt und in die Phasen getrennt. Die organische Phase wird eingeengt und der Rückstand mit 500 ml Ethanol und 200 ml konzentriertem Ammoniak 1 h bei Raumtemp. gerührt. Danach wird erneut im Vakuum eingeengt und das Rohprodukt an Kieselgel mit

5 Dichlormethan/Methanol = 30:1 als Laufmittel gereinigt. Man erhält den Alkohol als Öl. MS (ESI): 413 (M+H<sup>+</sup>), 395 (M+H<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O) [C<sub>26</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> M=412].

1-(4-Aminomethyl-phenyl)-3-(3-hydroxy-3-phenyl-propyl)-4-(4-methoxy-phenyl)-azetidin-2- on

10

7g 4-[3-(3-Hydroxy-3-phenyl-propyl)-2-(4-methoxy-phenyl)-4-oxo-azetidin-1-yl]-benzonitril werden in 200 ml Ethanol gelöst und nach Zugabe von 15 ml konzentriertem Ammoniak mit 7 g 50% wässrigem Raney-Nickel bei 50 bar Wasserstoff hydriert. Das nach Absaugen des Katalysators und Entfernen des

15 Lösungsmittels im Vakuum erhaltene Rohprodukt wird an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol/Ammoniak = 200:10:1 gereinigt. Man erhält das Amin. MS (FAB, + LiCl): 423 (M+Li<sup>+</sup>) [C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> M=416].

20 4-Azido-N-{4-[3-(3-hydroxy-3-phenyl-propyl)-2-(4-methoxy-phenyl)-4-oxo-azetidin-1-yl]-benzyl}-benzamid

140 mg 1-(4-Aminomethyl-phenyl)-3-(3-hydroxy-3-phenyl-propyl)-4-(4-methoxy-phenyl)-azetidin-2- on werden in 5 ml Dioxan gelöst und mit 0.1 ml Tributylamin

25 versetzt. Dazu gibt man unter Ausschluss grellen Lichts 88 mg 4-Azido-benzoësäure-succinimid-ester und röhrt ca. 1 h bei Raumtemperatur nach. Das nach dem Einengen verbleibende Rohprodukt wird an Kieselgel mit Ethylacetat/Heptan = 1:1 als Laufmittel gereinigt. MS (FAB): 562 (M+H<sup>+</sup>), 544 (M+H<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O) [C<sub>33</sub>H<sub>31</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub> M=561].

30 Analog in kleinem Maßstab und hoher Verdünnung erhält man unter Verwendung von Tritium- oder <sup>14</sup>C-markiertem Azidobenzoësäure-Aktivester (Fa. Amersham) radiomarkiertes Benzamid, das im Dünnschichtchromatogramm mit unmarkiertem 4-

Azido-N-{4-[3-(3-hydroxy-3-phenyl-propyl)-2-(4-methoxy-phenyl)-4-oxo-azetidin-1-yl]-benzyl}-benzamid coeluiert.

N-{4-[3-(3-Hydroxy-3-phenyl-propyl)-2-(4-methoxy-phenyl)-4-oxo-azetidin-1-yl]-benzyl}-5 acetamid

100 mg 1-(4-Aminomethyl-phenyl)-3-(3-hydroxy-3-phenyl-propyl)-4-(4-methoxy-phenyl)-azetidin-2- on werden in 20 ml Methanol gelöst und nach Zugabe von 0.3 ml Pyridin mit 0.3 ml Acetanhydrid versetzt. Nach 30 min bei Raumtemperatur ist die 10 Reaktion beendet, man engt im Vakuum ein und reinigt an Kieselgel mit Ethylacetat als Laufmittel. MS (ESI): 459(M+H<sup>+</sup>), 441 (M+H<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O) [C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> M=458].

Analog in kleinem Maßstab und hoher Verdünnung erhält man unter Verwendung von Tritium- oder <sup>14</sup>C-markiertem Acetanhydrid radiomarkiertes Acetamid, das mit 15 unmarkiertem N-{4-[3-(3-Hydroxy-3-phenyl-propyl)-2-(4-methoxy-phenyl)-4-oxo-azetidin-1-yl]-benzyl}- acetamid im Dünnschichtchromatogramm coeluiert.

3-(3-Hydroxy-3-phenyl-propyl)-4-(4-methoxy-phenyl)-1-(4-{{[2-(3-methyl-3H-diazirin-3-yl)- ethylamino]-methyl}-phenyl}-azetidin-2-on

20 100 mg 1-(4-Aminomethyl-phenyl)-3-(3-hydroxy-3-phenyl-propyl)-4-(4-methoxy-phenyl)-azetidin-2- on werden in 5 ml Dimethylformamid gelöst und mit Toluol-4-sulfonsäure-2-(3-methyl-3H-diazirin-3-yl)-ethyl ester unter Vermeidung grellen Lichts 6 h bei 60-70°C gerührt. Man versetzt mit Wasser, extrahiert mit Ethylacetat und entfernt 25 das Lösungsmittel im Vakuum. Anschließend wird zweimal mit trockenem Toluol versetzt und im Vakuum eingeengt. Das Rohprodukt wird an Kieselgel mit Dichlormethan/ Methanol = 20:1 als Laufmittel gereinigt.  
MS (ESI): 499 (M+H<sup>+</sup>) [C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> M=498].

30 Durch Verwendung von Tritium- oder <sup>14</sup>C-markiertem Diazirin erhält man auf gleichem Weg radiomarkiertes Azetidinon, das im Dünnschichtchromatogramm mit

unmarkiertem 3-(3-Hydroxy-3-phenyl-propyl)-4-(4-methoxy-phenyl)-1-(4-{[2-(3-methyl-3H-diazirin-3-yl)-ethylamino]-methyl}-phenyl)-azetidin-2-on coeluiert.

5 Erklärung der Figuren:

Fig 1a, Fig. 1b:

Markierung von Proteinen der Bürstensaummembran von Kaninchen mit radioaktiv markierten Verbindungen der Formel I oder II. Die Proteine wurden gefällt und auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Menge an Radioaktivität wurde mittels 10 quantitativer Fluorographie bestimmt. Auf der horizontalen Achse der Diagramme ist der Abstand vom Auftrag in cm, auf der vertikalen Achse das Zählergebnis in  $^3\text{H-dpm}$  aufgetragen. Die Fig. 1a zeigt im oberen Teil die Verteilung der Radioaktivität nach Markierung mit radioaktiv markierter Verbindung der Formel II und fluorographischem Nachweis.

15 In Fig. 1a wurde mit einer Verbindung der Formel I und in Fig. 1b mit einer Verbindung der Formel II markiert.

Spezifisch markierte Proteine sind an den Peaks erkennbar.

Fig 2a, 2b:

20 Kaninchen wurden 10 Tage mit einer Diät gefüttert, die hohe Konzentrationen an Cholesterin enthielt. Danach wurden Vesikel der Bürstensaummembranen dieser Tiere präpariert, anschließend wie beschrieben durch eine Verbindung der Formel I oder II behandelt, danach wurden die Proteine gefällt und auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Menge an Radioaktivität wurde mittels quantitativer Fluorographie 25 bestimmt. Auf der horizontalen Achse der Diagramme ist der Abstand vom Auftrag in cm, auf der vertikalen Achse das Zählergebnis in  $^3\text{H-dpm}$  aufgetragen.

In Fig. 2a wurde mit einer Verbindung der Formel I und in Fig. 2b mit einer Verbindung der Formel II markiert.

30 Man erhielt eine spezifische Markierung eines Proteins mit einem Molekulargewicht von 145 kDa.

## Abkürzungen:

h	Stunde(n)
LSC	Liquid Szintillation Counting
MS (FAB)	Massenspektrum (Fast Atom Bombardment)
5 MS (ESI)	Massenspektrum (Electrospray Ionisierung)
M	Masse

## Patentansprüche

1. Cholesterin absorbierendes Protein aus dem Darmgewebe eines Säuger-Organismus, erhältlich durch folgende Verfahrensschritte:

5 a) Bereitstellung von Darmzellen oder Teilen von diesen Darmzellen eines Säuger-Organismus,

b) Bereitstellung einer radioaktiv markierten Verbindung, welche als Inhibitor der intestinalen Cholesterinabsorption wirkt, und eine photolabile Gruppe enthält ,

c) In-Kontakt-Bringen der Darmzellen oder Teilen von diesen Darmzellen aus a) mit 10 einer Verbindung aus b),

d) Bestrahlung des Ansatzes gemäß c) mit UV-Licht,

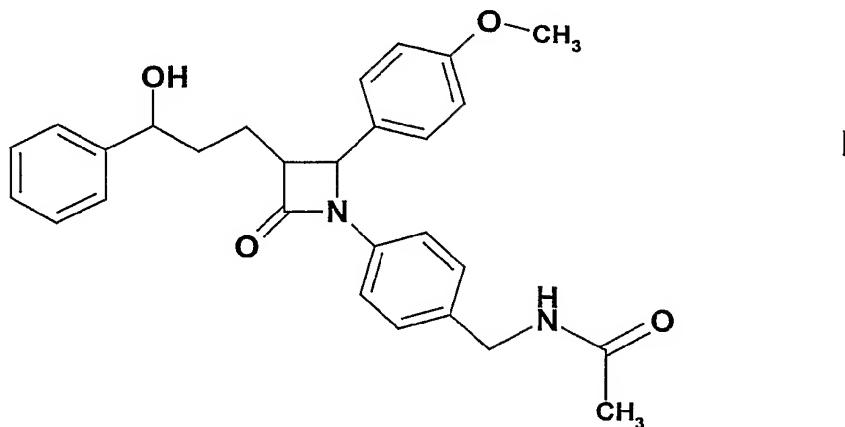
e) Aufschluß der Zellen nach Bestrahlung gemäß d),

f) Auftrennung der Bestandteile des Aufschlusses der Zellen nach Aufschluß gemäß e),

15 g) Nachweis eines Proteins nach Auftrennung gemäß f), welches eine Verbindung gemäß b) kovalent gebunden enthält.

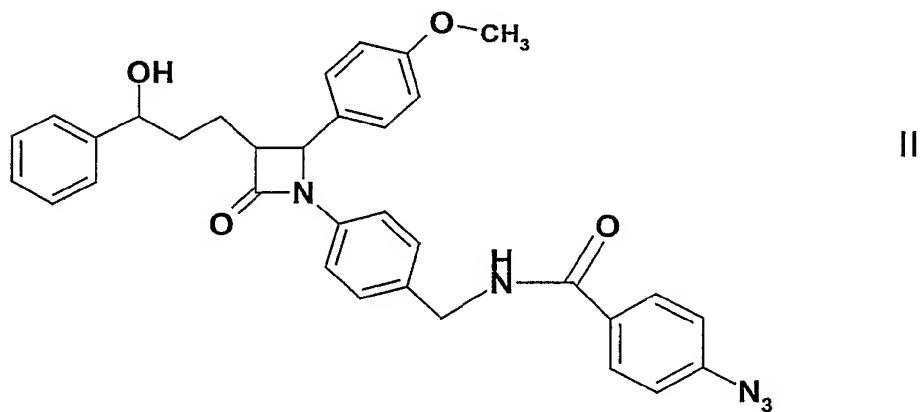
2. Ein Protein nach Anspruch 1, wobei die Darmzellen gemäß Verfahrensschritt a) von Mensch, Affe, Ratte, Rind, Schwein, Maus, Kaninchen oder Hamster stammen.

20 3. Protein nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Verbindung gemäß Verfahrensschritt b) eine Verbindung mit folgender Formel I



ist.

4. Protein nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Verbindung gemäß Verfahrensschritt b) eine Verbindung mit folgender Formel II

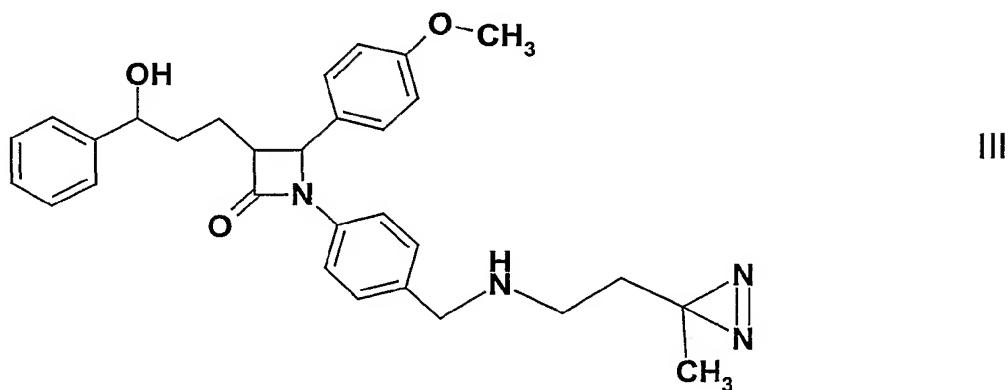


5

ist.

5. Protein nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Verbindung gemäß Verfahrensschritt b) eine Verbindung mit folgender Formel III

10



ist.

15 6. Protein nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Protein einen Inhibitor der intestinalen Cholesterinabsorption binden kann.

7. Protein nach Anspruch 6, wobei das Protein Azetidinone oder Saponine binden kann.
8. Protein nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, wobei das Protein 5 Cholesterin binden kann.
9. Protein nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, wobei das Protein oder Teile davon eine Größe von 150 bis 25 kDa haben.
- 10 10. Protein nach Anspruch 9, wobei das Protein oder Teile davon eine Größe von 150 kDa bis 32 kDa haben.
11. Protein nach Anspruch 10, wobei das Protein oder Teile davon eine Größe von 150 kDa bis 42 kDa haben .
- 15 12. Protein nach Anspruch 11, wobei das Protein eine Größe von 145 kDa hat.
13. Protein nach einem oder mehreren Ansprüche 9 bis 12, wobei das Protein glykosyliert ist.
- 20 14. Arzneimittel enthaltend ein Protein gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 13 bis 13.
15. Verwendung eines Proteins gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 13 25 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung einer Erkrankung der Cholesterinaufnahme oder Chosterinausscheidung, einer Lipidstörung, Atherosklerose oder Herzkreislauferkrankung.
16. Verfahren zur Identifizierung einer Verbindung, welche die intestinale 30 Cholesterinabsorption inhibiert, wobei das Verfahren folgende Verfahrensschritte enthält
- a) Bereitstellung Proteins gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 13,

- b) Bereitstellung einer Verbindung,
- c) In-Kontakt-Bringen eines Proteins gemäß a) mit einer Verbindung gemäß b),
- d) Bestimmung der Bindung der Verbindung aus b) an das Protein aus a).

5 17. Verwendung einer Verbindung, welche gemäß einem Verfahren des Anspruchs 16 identifiziert wurde, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung einer Erkrankung der Cholesterinaufnahme oder Cholesterinausscheidung, einer Lipidstörung, Atherosklerose oder Herzkreislauferkrankung.

10 18. Verfahren zur Gewinnung eines Proteins gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 13, wobei das Verfahren folgende Verfahrensschritte enthält:

- a) Bereitstellung einer Zelle enthaltend ein Protein gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 13,
- b) Bereitstellung eines chemischen Konjugats bestehend aus einem Polymer, wobei

15 das Polymer eventuell über einen Spacer an einen Inhibitor der intestinalen Cholesterinabsorption kovalent gebunden ist ,

- c) Aufschluß der Zelle aus a),
- d) In-Kontakt-Bringen des Aufschlusses aus der Zelle gemäß c) mit einem chemischen Konjugat aus b),

20 e) Separierung der nicht gebundenen Proteine und anderen Moleküle des Aufschlusses gemäß c) vom chemischen Konjugat,

- f) Elution der Proteine, welche nach In-Kontakt-Bringen gemäß d), mit chemischen Konjugat eine stabile Verbindung eingegangen sind sowie gegebenenfalls weitere Reinigung.

25

19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei die Zelle gemäß a) aus Darmgewebe eines Säuger-Organismus gewonnen wird.

20. Verfahren nach Anspruch 18, worin das chemische Konjugat gemäß b) an eine

30 Verbindung der Formel I, II oder III kovalent gebunden ist.

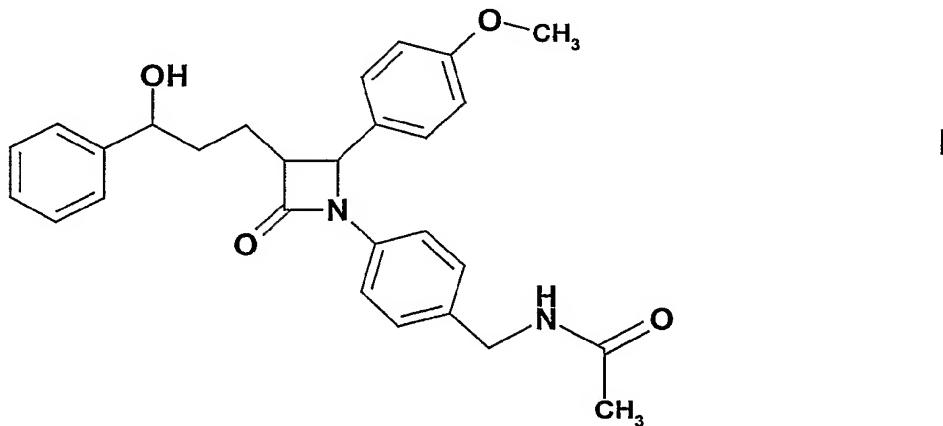
21. Chemisches Konjugat bestehend aus einem Polymer, wobei das Polymer eventuell über einen Spacer an einen Inhibitor der intestinalen Cholesterinabsorption kovalent gebunden ist.

5 22. Chemisches Konjugat gemäß Anspruch 21, wobei das Polymer an Verbindung der Formel I, II oder III kovalent gebunden ist.

23. Ein chemisches Konjugat nach Anspruch 21 oder 22, wobei an dieses ein Protein gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 13 gebunden ist.

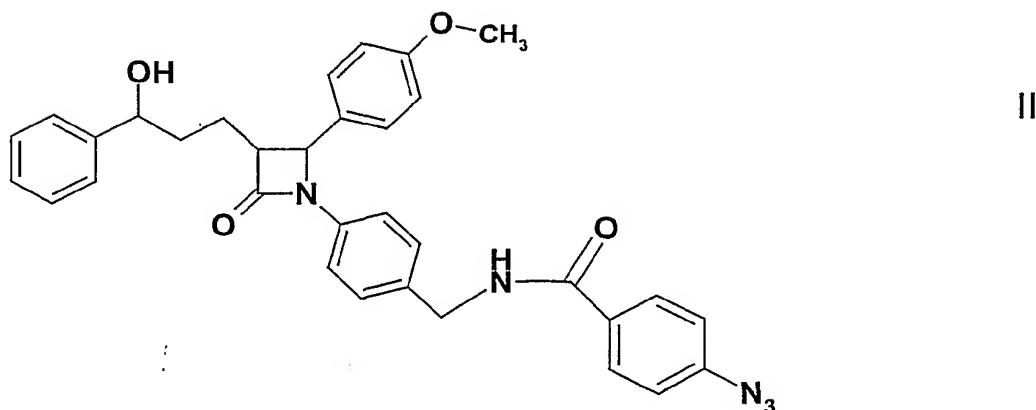
10

24. Verbindung der Formel I:

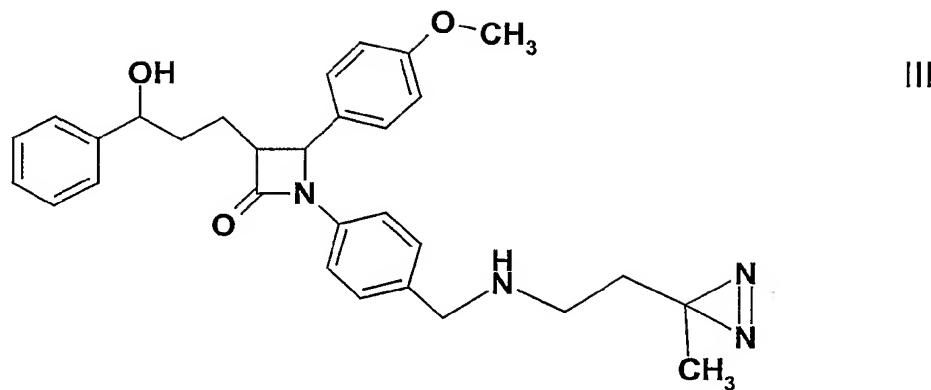


25. Verbindung der Formel II:

15



## 26. Verbindung der Formel III



5 27. Verwendung mindestens einer Verbindung gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 24 bis 26 zum Nachweis eines Proteins gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 13.

28. Diagnostischer Kit enthaltend mindestens eine Verbindung gemäß einem oder 10 mehreren der Ansprüche 24 bis 26 sowie Reagenzien zur Ausführung eines Assays zum Nachweis eines Proteins gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 13.

29. Verbindung 4-[3-(3-Brom-3-phenyl-propyl)-2-(4-methoxy-phenyl)-4-oxo-azetidin-1-yl]- benzonitril.

15

30. Verbindung 4-[3-(3-Hydroxy-3-phenyl-propyl)-2-(4-methoxy-phenyl)-4-oxo-azetidin-1-yl]- benzonitril.

31. Verbindung 1-(4-Aminomethyl-phenyl)-3-(3-hydroxy-3-phenyl-propyl)-4-(4-20 methoxy-phenyl)-azetidin-2- on.

32. Verwendung einer Verbindung gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 29 bis 31 zur Herstellung einer Verbindung gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 24 bis 26.